

学校编码: 10384

密级\_\_\_\_\_

学号: 22620091151181

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

海洋产电菌的染料脱色和产电特性研究

Study of Decolorization and Electricity Generation by  
Marine Exoelectrogenic Bacteria

邹 聪 慧

指导教师姓名: 徐方成 副教授

专 业 名 称: 环境工程

论文提交日期: 2012 年 5 月

论文答辩时间: 2012 年 6 月

2012年6月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（ 徐方成 ）课题（组）的研究成果，获得（ 中国大洋协会项目No.DYXM-115-02-2-15 ）课题（组）经费或实验室的资助，在（ 厦门大学化学化工学院卢嘉锡楼357 ）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）： 邹聪慧

2012 年 06 月 12 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于    年    月    日解密，解密后适用上述授权。

（ ☒ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年    月    日

摘 要 .....	IX
Abstract .....	X
表 索 引 .....	XII
图 索 引 .....	XIII
LIST OF TABLES .....	XV
LIST OF FIGURES .....	XVI
第一章 绪论 .....	1
1.1 染料废水 .....	1
1.1.1 染料废水的来源 .....	1
1.1.2 染料的分类 .....	2
1.1.3 染料废水的特点及危害 .....	3
1.2 染料废水处理方法 .....	3
1.2.1 物理法 .....	3
1.2.2 化学法 .....	4
1.2.3 生物法 .....	5
1.2.4 其他方法 .....	6
1.3 微生物染料脱色机理的研究进展 .....	6
1.3.1 脱色微生物 .....	6
1.3.2 三苯基甲烷类染料的降解机理 .....	7
1.3.3 蒽醌类染料的降解机理 .....	8
1.3.4 真菌吸附降解的机理 .....	8
1.3.5 偶氮染料的还原机制 .....	9
1.4 微生物燃料电池同时脱色产电的研究进展 .....	10
1.4.1 微生物燃料电池和产电微生物 .....	10
1.4.2 微生物燃料电池同时脱色产电 .....	13
1.4.3 微生物脱色产电的循环伏安法 .....	13

1.5 本论文的研究内容及意义 .....	14
1.5.1 研究的目的.....	14
1.5.2 研究的主要内容.....	15
第二章 实验材料与amp;方法 .....	17
2.1 实验材料.....	17
2.1.1 菌种来源.....	17
2.1.2 培养基.....	17
2.1.3 化学试剂.....	21
2.1.4 实验仪器.....	24
2.2 实验方法.....	26
2.2.1 脱色工艺与脱色容量.....	26
2.2.2 海洋产电菌的染料脱色特性.....	27
2.2.3 不同盐度条件下的染料脱色机理.....	28
2.2.4 染料降解产物分析及生物毒性实验.....	28
2.2.5 微生物燃料电池同时脱色产电.....	29
2.2.6 脱色产电的循环伏安法和差分脉冲伏安分析.....	32
2.3 分析方法.....	34
2.3.1 染料的标准曲线.....	34
2.3.2 细胞干重的测定.....	35
2.3.3 脱色率和脱色容量的计算.....	35
2.3.4 吸附动力学模型.....	35
2.3.5 脱色产物的 HPLC 和 UV-vis 光谱分析.....	36
2.3.6 脱色产物的 TOC 分析.....	37
2.3.7 脱色产物的 HPLC-MS 分析 .....	38
2.3.8 微生物燃料电池产电性能计算.....	38
2.3.9 循环伏安法和差分脉冲伏安法分析.....	39
第三章 海洋产电菌的生物脱色特性.....	41
3.1 染料的脱色工艺和脱色容量 .....	41
3.1.1 细胞干重与菌密度的关系.....	41

3.1.2 脱色实验工艺比较.....	41
3.1.3 好氧-厌氧工艺下的脱色容量 .....	43
3.2 初始 pH 和温度对产电菌脱色 XP2R 的影响.....	44
3.3 碳源和氮源对产电菌脱色偶氮染料的影响 .....	45
3.3.1 碳源对 EP1 脱色 XP2R 的影响 .....	45
3.3.2 氮源对 8121 脱色 AR73 的影响 .....	46
3.4 初始 NaCl 浓度对产电菌脱色 XP2R 的影响 .....	47
3.5 供氧浓度对产电菌脱色 XP2R 的影响 .....	48
3.6 染料初始质量浓度对 XP2R 脱色的影响 .....	49
3.7 不同属产电菌及混合菌群的染料脱色 .....	50
3.8 本章小结.....	52
第四章 染料脱色机制及产物分析.....	54
4.1 染料结构与种类对产电菌脱色能力的影响 .....	54
4.1.1 不同结构与种类染料的脱色对比.....	54
4.1.2 偶氮与蒽醌结构的脱色分析.....	55
4.1.3 不同结构染料脱色机理的 UV-vis 扫描 .....	56
4.2 海洋产电菌在不同盐度条件下对偶氮染料脱色机理初探 .....	57
4.2.1 净生物降解脱色率和净吸附脱色率.....	57
4.2.2 低盐度下的生物降解脱色.....	59
4.2.3 高盐度下的吸附盐析脱色.....	60
4.2.4 吸附动力学分析.....	61
4.2.5 不同盐度下的脱色机理对比分析.....	65
4.3 偶氮染料 XP2R 的脱色产物分析和降解途径 .....	66
4.3.1 脱色产物的液相色谱分析.....	66
4.3.2 脱色产物的质谱分析.....	68
4.3.3 染料降解途径分析.....	70
4.3.4 脱色过程的总有机碳分析.....	71
4.3.5 脱色产物的藻类生物毒性分析.....	73
4.4 本章小结.....	76

<b>第五章 微生物燃料电池同时偶氮染料脱色和生物产电</b>	76
<b>5.1 微生物燃料电池同时脱色产电中的电子分配平衡</b>	76
5.1.1 产电分析	76
5.1.2 脱色及菌株生长分析	78
<b>5.2 电化学方法分析脱色产电机理</b>	80
5.2.1 产电菌吸附电极的循环伏安法分析	80
5.2.2 产电菌生长的循环伏安法分析	81
5.2.3 染料及电子介体的循环伏安扫描	82
5.2.4 MFC 中的循环伏安法和差分脉冲伏安法分析	84
<b>5.3 本章小结</b>	86
<b>第六章 结论与展望</b>	88
6.1 结论	88
6.2 创新点	89
6.3 展望	89
<b>参考文献</b>	91
<b>附 录</b>	103
<b>发表论文及专利</b>	116
<b>致 谢</b>	117

## Contents

<b>Abstract</b> .....	X
<b>LIST OF TABLES</b> .....	XV
<b>LIST OF FIGURES</b> .....	XVI
<b>Chapter 1 Introduction</b> .....	1
<b>1.1 Dye wastewater</b> .....	1
1.1.1 Source of dye wastewater .....	1
1.1.2 Classification of dyes .....	2
1.1.3 Characteristic and harm of dye wastewater .....	3
<b>1.2 Treatment methods of dyeing wastewater</b> .....	3
1.2.1 Physical methods .....	3
1.2.2 Chemical methods .....	4
1.2.3 Biological methods .....	5
1.2.4 Other methods .....	6
<b>1.3 Progress in research on mechanisms of biodecolorization</b> .....	6
1.3.1 Microorganisms for dye decolorization .....	6
1.3.2 Biodegradation mechanism of triphenylmethane dyes .....	7
1.3.3 Biodegradation mechanism of anthraquinone dyes .....	8
1.3.4 Adsorption mechanism by fungi .....	8
1.3.5 Azo reduction mechanism .....	9
<b>1.4 Progress in bioelectricity generation and biodecolorization using MFC</b> ...	10
1.4.1 Microbial fuel cells and exoelectrogens .....	10
1.4.2 Electricity production and decolorization in MFC .....	13
1.4.3 Cyclic voltammetry of electricity production and decolorization .....	13
<b>1.5 Contents and objectives of this research</b> .....	14
1.5.1 Objectives of this research .....	14
1.5.2 Contents of this research .....	15
<b>Chapter 2 Materials and methods</b> .....	17



<b>2.1 Materials</b>	17
2.1.1 Microorganism	17
2.1.2 Culture mediums	17
2.1.3 Chemicals	21
2.1.4 Apparatus and equipments	24
<b>2.2 Experimental methods</b>	26
2.2.1 Decolorization processes and decolorization capacity	26
2.2.2 Decolorization characteristics by exoelectrogenic bacteria from sea	27
2.2.3 Decolorization mechanism under different salinity conditions	28
2.2.4 Degradation products and toxicity test	28
2.2.5 Simultaneous decolorization and electricity production using MFC	29
2.2.6 Cyclic voltammetry and differential pulse voltammetry	32
<b>2.3 Analysis methods</b>	34
2.3.1 Standard curve of dyes	34
2.3.2 Determination of cell dry weight	35
2.3.3 Calculation of decolorization rate and decolorization capacity	35
2.3.4 Adsorption kinetics models	35
2.3.5 Analysis of HPLC and UV-vis spectra of decolorization products	36
2.3.6 Analysis of TOC of decolorization products	37
2.3.7 Analysis of HPLC-MS of decolorization products	38
2.3.8 Performances of power production in MFC	38
2.3.9 Cyclic voltammetry and differential pulse voltammetry in MFC	39
<b>Chapter 3 Biodecolorization by marine exoelectrogen</b>	41
<b>3.1 Decolorization processes and decolorization capacity</b>	41
3.1.1 Relationship between cell dry weight and optical density	41
3.1.2 Comparision of different decolorization processes	41
3.1.3 Decolorization capacity under aerobic-anaerobic conditions	43
<b>3.2 Effects of initial pH and temperature on decolorization of XP2R</b>	44
<b>3.3 Effects of carbon and nitrogen sources on decolorization</b>	45

3.3.1 Effects of carbon sources on decolorization of XP2R .....	45
3.3.2 Effects of nitrogen sources on decolorization of AR73 .....	46
<b>3.4 Effects of initial NaCl concentration on decolorization of XP2R .....</b>	<b>47</b>
<b>3.5 Effects of oxygen concentration on decolorization of XP2R .....</b>	<b>48</b>
<b>3.6 Effects of initial dyes concentration on decolorization of XP2R .....</b>	<b>49</b>
<b>3.7 Decolorization by mixed community .....</b>	<b>50</b>
<b>3.8 Summary .....</b>	<b>52</b>
<b>Chapter 4 Decolorization mechanism and products analysis .....</b>	<b>54</b>
<b>4.1 Effects of the dye structure and type on decolorization .....</b>	<b>54</b>
4.1.1 Decolorization of different dye structures and types .....	54
4.1.2 Study on decolorization of azo and anthraquinone structures .....	55
4.1.3 Analysis of UV-vis spectra of decolorization mechanisms .....	56
<b>4.2 Decolorization mechanism of azo dyes under different salinity .....</b>	<b>57</b>
4.2.1 Net biodecolorization and adsorption decolorization .....	57
4.2.2 Biodegradation under low NaCl concentration .....	59
4.2.3 Adsorption or salting decolorization under high NaCl concentration .....	60
4.2.4 Adsorption kinetics .....	61
4.2.5 Decolorization mechanisms under different salinity .....	65
<b>4.3 Biodecolorization products and biodegradation pathway of XP2R .....</b>	<b>66</b>
4.3.1 Analysis of HPLC .....	66
4.3.2 Analysis of HPLC-MS .....	68
4.3.3 Analysis of biodegradation pathway .....	70
4.3.4 Analysis of TOC .....	71
4.3.5 Toxicity test on algae by biodegradation products .....	73
<b>4.4 Summary .....</b>	<b>74</b>
<b>Chapter 5 Decolorization and electricity generation by MFC .....</b>	<b>76</b>
<b>5.1 Electron distribution in MFC .....</b>	<b>76</b>
5.1.1 Power production in MFC .....	76
5.1.2 Decolorization and strain growth in MFC .....	78

<b>5.2 Study of the mechanism using electrochemical methods</b> .....	80
5.2.1 Marine exoelectrogens adsorbing on electrode using CV .....	80
5.2.2 Analysis of exoelectrogens growth using CV .....	81
5.2.3 CV scan of dyes and electron mediator .....	82
5.2.4 Analysis of CV and DPV in MFC.....	84
<b>5.3 Summary</b> .....	86
<b>Chapter 6 Conclusions and Prospects</b> .....	88
<b>6.1 Conclusions</b> .....	88
<b>6.2 Innovative points</b> .....	89
<b>6.3 Prospects</b> .....	89
<b>References</b> .....	91
<b>Appendix</b> .....	103
<b>Published papers &amp; Patent application</b> .....	116
<b>Acknowledgement</b> .....	117

## 摘 要

产电菌是近年来发现的一类新型的微生物资源,这类微生物具有独特的胞外电子传递途径,能将代谢产生的电子传递给位于细胞外面的最终电子受体,并偶联微生物的生长和代谢。目前,产电菌主要用于微生物燃料电池(MFCs)产电。偶氮染料属于难降解有机物,现有研究认为偶氮键的还原断裂是脱色的关键步骤,特别是含有磺酸基的偶氮染料极性大、分子量大,不容易转运到细胞内,需要添加人工电子介体才能降解脱色。基于相类似的胞外电子传递机理,本论文首次研究了海洋产电菌在偶氮染料这类难降解污染物的降解和产电方面的应用,重点研究了脱色能力、降解机理、同时脱色产电、高盐对脱色和产电的影响等内容。

本论文首先考察了近海海洋产电菌 *Shewanella marisflavi* EP1 对偶氮染料、三苯基甲烷类染料和蒽醌染料的脱色特性。EP1 菌株的最优脱色条件为:厌氧, 30℃~35℃, pH 7.0~8.0, NaCl 浓度为 1%, 以乳酸为碳源, 以 NH<sub>4</sub>Cl 为氮源, 在染料初始质量浓度为 50 mg/L 时, 10 h 内脱色率达 99.95%。

随后阐明了偶氮染料的脱色机制: NaCl 浓度为 0%~8%时, 脱色机制为生物降解, 且降解率随 NaCl 浓度的提高而降低; NaCl 浓度为 8%~30%时, 脱色机制主要为吸附和盐析, 且吸附率随 NaCl 浓度的增加而增加, 吸附速率符合拟二级动力学方程。分析 XP2R 的代谢产物和降解途径: XP2R 首先进行厌氧偶氮还原, 产生两种中间产物; 接着在好氧条件下, 通过两种断键途径, 得到最终产物为 2-甲基-3-氨基-*p*-苯醌或 1-氨基-2 萘酚。整个脱色过程中, 总有机碳去除率不断增加, 最终为 48%; 染料及其产物对两种藻类的生物毒性较小。

再者, 研究了 EP1 菌株利用 MFC 技术同时脱色产电时的电子传递机理。阳极产生的电子首先传递给电极用于产电, 再进行厌氧偶氮还原脱色反应。同时脱色产电时, 染料能够促进产电, 最大功率密度为 17.73 mW/m<sup>2</sup>, 库仑效率是单纯产电时的 1.6 倍; 并且产电过程加快了染料的偶氮还原速率。产电菌 EP1 产生一些电子传递组分用以脱色或产电, 玻碳电极下, 该组分在电位为-0.15 V 和+0.1 V 处产生了一对氧化还原峰。MFC 运行中阳极液的差分脉冲伏安曲线表明细菌产生的氧化还原物质种类多且量小。

**关键词:** 海洋产电菌; 生物脱色; 偶氮还原; 胞外电子传递途径; 微生物燃料电池

## Abstract

Exoelectrogens, possessing unique extracellular electron transfer pathways, is new type of microbial resources discovered recently. By transferring electrons to a terminal acceptor outside the cells, they harvest energy which is needed for cell growth and other metabolism of microorganisms. At present, this bioresource is mainly utilized to produce electricity in microbial fuel cells (MFCs). Azo dyes, especially azo dyes containing sulfonic acid groups, are difficult to penetrate into the cells due to the strong polarity and large molecular weight. This refractory organics require adding additional electron mediators to the biodegradation of the azo dyes containing sulfonate groups and studies suggest that reductive cleavage of azo bond is a key step. Based on similar extracellular electron transfer mechanism, we reported electricity generation and biodegradation applications of azo dyes such recalcitrant pollutants by the marine exoelectrogens for the first time. In this thesis, we focused on the decolorization capacity, degradation mechanisms, simultaneous decolorization and electricity production in MFC and effects of high salinity on decolorization or electricity production.

Firstly, decolorization characteristics of azo, triphenylmethane and anthraquinone dyes by marine exoelectrogens *Shewanella marisflavi* EP1 were investigated. Its optimal conditions were anaerobic, 30°C~35°C, pH 7.0~8.0, NaCl concentration of 1%, lactate as the carbon source and NH<sub>4</sub>Cl as the nitrogen source. Under the optimal conditions, decolorization rate was up to 99.95% in 10 h as an initial dye concentration of 50 mg/L.

Sequencely, decolorization mechanisms were further clarified in this thesis. When the NaCl concentrations were ranging from 0% to 8%, the decolorization mechanisms were mainly biological degradation and the degradation rates responded oppositely with the NaCl concentrations. When the NaCl concentrations were ranging from 8% to 30%, the decolorization mechanisms were adsorption and salting-out. The adsorption rates increased correspondly with the increasing NaCl concentration and it can be analyzed by the pseudo-second order kinetic model. Xylidine Ponceau 2R were

firstly degraded to two intermediates after azo reduction under anaerobic conditions. Then through two different pathways, the intermediates were decomposed to the final products 2-methyl-3-amino-*p*-benzoquinone or 1-amino-2-naphthol when supplied adequate aeration. The dyes and their metabolites were little toxicity to the two algae. In the whole process, total organic carbon removal rate gradually enhanced to 48%.

Lastly, we discussed electron transfer mechanisms of decolorization and electricity generation in MFC by strain EP1. Electrons in the anode chamber firstly were transferred to electrode for power output, and then they were used for anaerobic azo reduction. In this process, the azo dyes enhanced the electricity generation that the maximum power density was 17.73 mW/m<sup>2</sup> and the coulomb efficiency was 1.6 times of the electricity production alone. At the same time, the electricity production process accelerated the azo reduction rate. Strain EP1 secreted some electron transport substances for decolorization or electricity generation. With a glassy carbon electrode as work electrode, there produced a pair of redox peaks at the potential of -0.15 V and +0.1 V in the curve. Differential pulse voltammetry curves of solution from operating anode chamber of microbial fuel cell showed that the electron transport substances were different types of small amount.

**Key Words:** Marine exoelectrogens; Biodecolorization; Anaerobic azo reduction; Extracellular electron transfer pathway; Microbial fuel cell

## 表 索 引

- 表 1-1 染料及其发色基团
- 表 1-2 脱色微生物分类
- 表 2-1 LB 培养基
- 表 2-2 改进型 2216E 培养基
- 表 2-3 乳酸脱色培养基
- 表 2-4 M6 基础培养液组成成分
- 表 2-5 Wolfe's 微量元素液组成成分
- 表 2-6 Zarrouk 培养基
- 表 2-7 微量元素液 A 的组成成分
- 表 2-8 微量元素液 B 的组成成分
- 表 2-9 BG-11 培养基
- 表 2-10 不同染料及其中间体
- 表 2-11 生化试剂
- 表 2-12 实验设备仪器
- 表 2-13 微生物燃料电池装置和材料
- 表 2-14 电化学方法测定装置及材料
- 表 2-15 MFC 同时生物脱色和产电的构建和运行
- 表 3-1 菌株对 MB 和 MG 染料的完全脱色时间
- 表 3-2 EP1 和 DS1 菌株对不同染料的脱色能力比较
- 表 4-1 不同结构染料的脱色对比
- 表 4-2 偶氮染料含有的基团情况
- 表 4-3 不同盐度下染料脱色后 EP1 菌株的生长情况
- 表 5-1 MFC 脱色产电时的产电数据对比

## 图 索 引

- 图 1-1 微生物燃料电池的工作原理图
- 图 1-2 两种胞外电子传递途径示意图
- 图 2-1 染料及其中间体的化学结构式
- 图 2-2 石墨电极结构示意图
- 图 2-3 MFC 产电脱色测试装置
- 图 2-4 电化学工作站专用电解池结构示意图
- 图 2-5 循环伏安扫描与差分脉冲伏安法中的激励信号
- 图 3-1 EP1 菌株细胞干重与菌密度的关系
- 图 3-2 好氧-好氧(左)和好氧-厌氧(右)工艺条件下的染料脱色比较
- 图 3-3 不同脱色工艺条件下产电菌的生长情况
- 图 3-4 初始 pH 和温度对 EP1 菌脱色性能的影响
- 图 3-5 不同碳源对 EP1 菌脱色性能的影响
- 图 3-6 不同氮源及其浓度对 8121 菌脱色性能的影响
- 图 3-7 低盐度下 NaCl 浓度对 EP1 菌生物脱色的影响
- 图 3-8 供氧浓度对 S2 菌脱色性能的影响
- 图 3-9 染料浓度对混合菌群脱色性能的影响
- 图 3-10 混合菌群的染料脱色性能和菌株生长的比较
- 图 4-1 不同结构染料的降解脱色
- 图 4-2 净生物降解脱色及吸附脱色曲线
- 图 4-3 低盐度下 XP2R 脱色产物光谱扫描图
- 图 4-4 高盐度下 XP2R 脱色产物光谱扫描图
- 图 4-5 不同盐度下 EP1 菌脱色 XP2R 的照片
- 图 4-6 不同染料浓度下的拟二级动力学方程
- 图 4-7 不同盐度下的拟二级动力学方程
- 图 4-8 不同盐度下的 XP2R 脱色机理光谱扫描图
- 图 4-9 XP2R 降解产物的 HPLC 和 UV-vis 分析
- 图 4-10 XP2R 降解产物的 HPLC-MS 分析
- 图 4-11 产电菌生物催化 XP2R 的降解产物示意图



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库